

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 129–136

Verteilung heterologer, homologer und autologer Enzyme nach intravenöser Injektion

Verteilung und Transport von Zellenzymen im extrazellulären Raum, III. Mitteilung

Von R. Friedel¹⁾, R. Bode und I. Trautschold

Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 9. April/17. Dezember 1975)

Zusammenfassung: Die Verschwinderraten intravenös injizierter Zellenzyme heterologen, homologen und autologen Ursprungs aus dem Blutplasma wurden untersucht. Innerhalb des Versuchszeitraumes von maximal 240 min erfolgten die Aktivitätsabnahmen exponentiell in einer oder zwei Phasen. Die Konstante der ersten oder – bei einphasiger Kinetik – einzigen Exponentialfunktion $A = A_0 \cdot e^{-kt}$ kann als Maß für die Permeabilität der Kapillarmembran herangezogen werden. Bei zweiphasiger Kinetik charakterisiert die Konstante der zweiten Funktion die Eliminationsgeschwindigkeit des betreffenden Enzyms aus dem extrazellulären Raum. Folgt die Aktivitätsabnahme einer einphasigen Kinetik, bestimmt die Permeabilität der Kapillarmembran zugleich die Geschwindigkeit der Elimination.

Für homologe und autologe Enzyme (Organextrakte) besteht eine enge Beziehung zwischen ihren Molekulargewichten und ihrem Austausch zwischen Intravasalraum und Interstitium. Für heterologe (reine) Enzyme wurde eine solche Beziehung nicht gefunden. Es wird diskutiert, worauf diese Diskrepanz zurückzuführen ist. Für das Studium der Verteilung von Zellenzymen im extrazellulären Raum sind heterologe Enzyme in der Regel nicht geeignet.

Nach einem Enzymaustritt aus geschädigten Zellen überlagern sich Verteilung, Transport und Elimination von Zellenzymen in teilweise gegenläufigen Prozessen. Es wird diskutiert, welche Grenzen den bisher üblichen Methoden zum Studium der Enzymelimination durch diese Prozesse gesetzt sind. Es erscheint problematisch, allein aus den in klinischen Verlaufsbeobachtungen ermittelten Eliminationsraten von Zellenzymen aus dem Blutplasma und aus der aktuellen Plasma-Aktivität auf das Ausmaß des ursprünglichen Enzymaustritts schließen zu wollen.

Distribution of intravenously injected enzymes of heterologous, homologous and autologous origin. Distribution and transport of cell enzymes within the extracellular space, III

Summary: The disappearance rates of intravenously injected enzymes of heterologous, homologous and autologous origin were determined in rats. Within four hours after administration, the activities show an exponential decline, that is either mono- or biphasic. The constant of the exponential function is a measure of the capillary permeability. In the case of biphasic disappearance this holds true only for the first slope, whereas the second one represents the elimination of active enzyme molecules from the extracellular space. If the decline in enzyme activity is monophasic the elimination of those enzymes from the interstitial space is limited by the permeability of the capillary membrane.

Enzymes of homologous and autologous origin (extracts of liver or muscle) show a close correlation between their molecular weights and their rates of distribution within the extracellular compartment. For heterologous enzymes (crystallized) such a correlation could not be found. Possible causes for these differences in distribution are discussed. Heterologous and/or crystallized enzymes seem not to be suited for studies on the distribution of cell enzymes within the extracellular space.

After enzymes are released from injured cells they undergo the processes of distribution, transport and elimination which are superimposed. The effects of the distribution and transport of enzymes on the results of clinical studies on enzyme elimination are discussed. It seems questionable at this point to assume that from the elimination rate of enzymes and their actual plasma activity one can account for the amount of enzymes originally released from injured cells.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Einleitung und Fragestellung

In der vorangegangenen Mitteilung (1) konnte für die Aktivitäten von 10 Zellenzymen in der Darmlymphe der Ratte gezeigt werden, daß unter physiologischen Bedingungen ein enger Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der Enzyme und ihrem Aktivitäts-Quotienten Plasma/Lympe besteht. Die Größe des Plasma/Lymph-Quotienten wird bestimmt durch

- a) den ständigen Nachstrom von Enzymaktivität aus dem Intrazellularraum über das Interstitium in die Lymphe,
- b) die Kapillarpermeabilität, die den Ausstrom von Enzymaktivität aus dem Interstitium in den Intravasalarraum und umgekehrt den Einstrom vom Intravasalarraum in das Interstitium reguliert, und
- c) die ständige Elimination von Enzymaktivität aus dem extrazellulären Raum.

Aus der Literatur ist bekannt, daß offenbar kein Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht von Enzymen und ihren Eliminationsraten besteht (2–5). Wir selbst haben in der vorangegangenen Mitteilung (1) keinen Zusammenhang zwischen den Aktivitäts-Gradienten von Zellenzymen über der Zellmembran und ihren Molekulargewichten oder ihrer intrazellulären Lokalisation feststellen können. Demnach müßte die Beziehung zwischen Plasma/Lymph-Quotient und Molekulargewicht von Zellenzymen vornehmlich durch die Kapillarpermeabilität bestimmt sein, es müßte also – wie auch bei anderen Makromolekülen – die Geschwindigkeit des Austausches von Zellenzymen über die Kapillarmembran von ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Molekülgröße abhängig sein.

Mit den hier vorgelegten Untersuchungen sollte geprüft werden, ob ein derartiger Zusammenhang besteht und ob er geschwindigkeitsbestimmend für die extrazelluläre Verteilung, den Transport und evtl. auch die Elimination von Zellenzymen sein kann. Dazu war es notwendig, das physiologische Fließgleichgewicht zwischen Intravasalarraum und Interstitium durch akute Erhöhung der Aktivität in einem der beiden Räume zu stören und die Kinetik der Neueinstellung zu beobachten. Der den pathophysiologischen Mechanismus imitierende Versuchsansatz, die Aktivität im Interstitium akut zu erhöhen, ist aus methodischen Gründen nicht realisierbar. Es wurde daher die andere Möglichkeit gewählt, die Aktivität im Intravasalarraum durch intravenöse Injektion akut zu erhöhen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Verteilung intravenös injizierter Enzyme heterologer, homologer und autologer Herkunft unterschiedlich verläuft.

Methodik

Tiermaterial

Sämtliche Versuche wurden an männlichen Ratten vom Stamm HAN:WISTAR mit einem Körpergewicht von 180–250 g durchgeführt. Die Tiere wurden konventionell gehalten (Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50 \pm 5\%$, Licht von

07.00 bis 19.00 Uhr). Bis zu Versuchsbeginn hatten sie Altromin R 1320 und Trinkwasser ad libitum erhalten. In Pentobarbital-Narkose wurde ein PVC-Katheter in die rechte V. jugularis eingebunden. Die Injektionen erfolgten nach Punktion einer freigelegten V. femoralis. In der Regel wurde Blut zu folgenden Zeiten entnommen: Zweimal vor der Injektion, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 180 min danach.

Meßmethoden

Es wurden folgende Enzyme untersucht:

Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27)
 Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37)
 Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3)
 Aspartataminotransferase (EC 2.6.1.1)
 Alaninaminotransferase (EC 2.6.1.2)
 Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)
 Creatinkinase (EC 2.7.3.2)
 Adenylatkinase (EC 2.7.4.3)
 Aldolase (EC 4.1.2.13)

Einzelheiten zur Methodik sind in der vorangegangenen Mitteilung (1) angegeben.

Enzympräparate

Heterologe Enzyme wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Lactatdehydrogenase: Kaninchenmuskel, spezifische Aktivität 550 U/mg;

Malatdehydrogenase: Schweineherz, mitochondrial, spezifische Aktivität 1100 U/mg;

Glutamatdehydrogenase: Rinderleber, spezifische Aktivität 120 U/mg;

Aspartataminotransferase: Schweineherz, spezifische Aktivität 200 U/mg;

Alaninaminotransferase: Schweineherz, spezifische Aktivität 80 U/mg;

Pyruvatkinase: Kaninchenmuskel, spezifische Aktivität 200 U/mg;

Creatinkinase: Kaninchenmuskel, spezifische Aktivität 25 U/mg (Creatin als Substrat);

Adenylatkinase: Kaninchenmuskel, spezifische Aktivität 360 U/mg;

Aldolase: Kaninchenmuskel, spezifische Aktivität 9 U/mg;

Lactatdehydrogenase-Isoenzyme:

LDH1(H₄), Schweineherz, spezifische Aktivität 360 U/mg;

LDH2(H₃M), Schweineherz, spezifische Aktivität 200 U/mg;

LDH3(H₂M₂), Schweinemuskel, spezifische Aktivität 200 U/mg;

LDH4(HM₃), Schweinemuskel, spezifische Aktivität 100 U/mg;

LDH5(M₄) Schweinemuskel, spezifische Aktivität 450 U/mg.

Es handelte sich in sämtlichen Fällen um Kristall-Suspensionen in 3,2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung. Diese Lösungen wurden unmittelbar vor der Injektion mit *Krebs-Ringer*-Hydrogencarbonat-Puffer unter Zusatz von Rinderserum-Albumin (70 g/l) auf Aktivitäten um 50 kU/l verdünnt; injiziert wurden jeweils 300 µl.

Für die Untersuchungen homologer Enzyme wurden Extrakte injiziert, die frisch aus Muskel oder Leber gewonnen waren. Die Gewebe wurden Tieren im Ätherrausch entnommen, in *Krebs-Ringer*-Hydrogencarbonat-Puffer aufgenommen, mit einem Ultra-Turraz 3 × 30 s unter Eiskühlung homogenisiert und 6 min mit $12\,000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Aktivitäten der Extrakte wurden so eingestellt, daß mit einem Volumen von 200–300 µl insgesamt um 15 U der einzelnen Enzyme injiziert wurden.

Autologe Enzyme wurden ebenfalls in Form von Extrakten aus Muskel oder Leber injiziert. Ein kleiner Leberlappen wurde möglichst dicht an der Leberpforte unter Schonung des restlichen Organes abgebunden und exziiert (Gewicht 300–400 mg), das Abdomen mit Klemmen geschlossen. Das Muskelgewebe entstammte dem M. pectoralis major. Die weitere Aufarbeitung

erfolgte wie bei homologen Enzymen. Zwischen der Gewebse-
ntnahme unmittelbar nach Beginn der Narkose und der Enzym-
injektion vergingen etwa 30 min.

In Kontrollversuchen, in denen den Tieren Gewebe entnommen
wurde, ohne daß eine Injektion von Enzymen folgte, war sicher-
gestellt, daß weder die Narkose von bis zu 270 min Dauer noch
die Entnahme von Gewebe oder Blut (vor der Injektion etwa
200 µl, danach 50–100 µl, insgesamt bis zu 10mal) Einfluß auf
die Enzymaktivitäten im Serum hatte.

Mathematische Auswertung

Von den Meßwerten wurde der Basalwert (Enzym-Aktivität im
Serum vor der Injektion) subtrahiert. Die Enzym-Aktivität der
ersten Probe nach der Injektion wurde 100 gesetzt und alle
späteren Werte darauf bezogen. Die Kinetik der Aktivitäts-
abnahme wurde auf monophasigen oder biphasigen Verlauf
geprüft und durch Regression einer oder zwei Exponentialfunk-
tionen angepaßt:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt}$$

bzw. als Regressionsgerade:

$$\ln A = \ln A_0 - kt$$

Aus der Konstanten k wurde die Halbwertszeit ($T/2$ oder HWZ)
berechnet nach

$$T/2 = \frac{\ln 2}{k}$$

$T/2$ wurde für jedes Versuchstier getrennt berechnet und die
Werte dann gemittelt. Die Korrelationskoeffizienten r der Regres-
sionsgeraden wurden aus den vorher gemittelten relativen Aktivi-
täten berechnet.

Ergebnisse

Die intravasalen Halbwertszeiten (HWZ) heterologer, ho-
mologer und autologer Zellenzyme nach intravenöser
Injektion sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Alle
Angaben beziehen sich auf einen Beobachtungszeitraum
von minimal 180 min, maximal 240 min.

Die Lactatdehydrogenase-5 zeigte eine biphasige Akti-
vitätsabnahme, die Unterschiede zwischen der 1. und 2.
Phase waren jedoch in keinem Falle statistisch signifikant.

Tab. 1. Halbwertszeiten (min) i.v. injizierter Enzyme heterologen, homologen und autologen Ursprungs.
Versuchstier: Ratte; r : Korrelationskoeffizient der zugehörigen Regressionsgeraden.

		heterolog		homolog		autolog	
		1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase
Lactatdehydrogenase Isoenzym 5(M ₄)	\bar{x}	25,2	48,6	28,2	34,3	49,8	54,0
	$s_{\bar{x}}$	2,1	12,6	1,6	4,3	4,5	2,4
	n	8	8	9	9	5	5
	r	0,9949	0,9897	0,9988	0,9803	0,9964	0,9977
Malatdehydrogenase	\bar{x}	5,3	25,5	23,1	38,8		34,8
	$s_{\bar{x}}$	0,6	5,5	2,9	2,6		3,0
	n	5	6	7	7		6
	r	0,9836	0,9842	0,9989	0,9803		0,9945
Glutamatdehydrogenase	\bar{x}		294		225		242
	$s_{\bar{x}}$		10		17		17
	n		8		7		9
	r		0,9972		0,9875		0,9897
Aspartataminotransferase	\bar{x}		185	29,3	93,3	32,2	137
	$s_{\bar{x}}$		11	0,1	12,8	2,5	13,8
	n		8	10	10	8	8
	r		0,9924	0,9999	0,9801	0,9983	0,9896
Alaninaminotransferase	\bar{x}		442	55,7	181	46,4	264
	$s_{\bar{x}}$		29	6,3	32,3	3,3	19
	n		4	6	6	8	8
	r		0,9943	0,9963	0,9687	0,9968	0,9933
Pyruvatkinase (Muskel)	\bar{x}		437		434		350
	$s_{\bar{x}}$		55		54		38
	n		6		6		8
	r		0,9380		0,9523		0,9678
Creatinkinase	\bar{x}	43,7	78,9	8,8	34,8	10,6	33,0
	$s_{\bar{x}}$	3,3	4,8	1,3	4,5	0,4	2,3
	n	9	9	6	6	8	8
	r	0,9983	0,9955	0,9940	0,9818	0,9997	0,9969
Adenylatkinase	\bar{x}	4,8	52,0	3,7	59,3	5,4	51,0
	$s_{\bar{x}}$	0,7	13,8	0,3	8,5	1,3	12,0
	n	6	6	6	6	7	7
	r	0,9937	0,9518	0,9986	0,9780	0,9998	0,9646
Aldolase	\bar{x}	52,3	208	43,3	263	61,0	262
	$s_{\bar{x}}$	9,6	26	8,1	34	12,0	25
	n	8	8	5	5	7	7
	r	0,9994	0,9948	0,9999	0,9947	0,9999	0,9979

Besonders beim homologen und beim autologen Enzym erfolgte die Trennung in zwei Phasen nicht aus statistischen Gründen sondern wegen der besseren Anpassung der Meßwerte an zwei Regressionsgeraden. Während für heterologe Malatdehydrogenase ein biphasiger Aktivitätsabfall ($2P < 0,01$) mit einer extrem kurzen HWZ in der ersten Phase beobachtet wurde, war beim autologen Enzym nur eine Phase erkennbar. Das homologe Enzym verhielt sich in der Kinetik wie die heterologe Form mit allerdings signifikant längeren HWZ sowohl in der 1. ($2P < 0,001$) als auch in der 2. Phase ($2P < 0,05$). Bei der Glutamatdehydrogenase verlief die Aktivitätsabnahme in allen drei Fällen monophasig, die HWZ waren weitgehend identisch. Die Abnahme der Aktivität heterologer Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase zeigte eine monophasige Kinetik, bei den homologen und autologen Formen war die Unterscheidung von zwei Phasen in jedem Falle statistisch zu sichern ($2P < 0,001$). Nicht signifikant waren für Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase die Unterschiede zwischen dem homologen und dem autologen Enzym. Bei der Pyruvatkinase ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen der heterologen, der homologen und der autologen Form; der Aktivitätsabfall verlief stets einphasig. Bei der Creatinkinase konnte für jede Form die Trennung der Kinetik in zwei Phasen gesichert werden ($2P < 0,0001$). Beim heterologen Enzym wurden für beide Phasen signifikant längere HWZ gefunden ($2P < 0,001$) als bei der homologen und autologen Form, die sich untereinander in keiner von beiden Phasen unterschieden. Sowohl Adenylatkinase als auch Aldolase zeigten innerhalb der Gruppe weitgehend identische Daten. Die Kinetik der Aktivitätsabnahme folgte jeweils zwei Phasen.

In der Abbildung 1 ist der Aktivitätsabfall intravenös injizierter heterologer Lactatdehydrogenase-Isoenzyme dargestellt. Die Versuche wurden bereits 120 min nach der Injektion abgebrochen. Die Unterscheidung von zwei Phasen ließ sich nur für die Lactatdehydrogenase-5 statistisch sichern ($2P < 0,05$). Bei den restlichen Isoenzymen wurde die Anpassung der Kinetik an zwei Regressionsgeraden in Analogie hierzu vorgenommen. Für die Lactatdehydrogenase-1 und Lactatdehydrogenase-2 wurde in beiden Phasen ein nahezu gleichlaufender langsamer Aktivitätsabfall beobachtet; die Aktivitäten der Isoenzyme 3, 4 und 5 nahmen in der angegebenen Reihenfolge in beiden Phasen signifikant schneller ab. Die für die Lactatdehydrogenase-5 ermittelten HWZ sind weitgehend identisch mit den Angaben in der Tabelle 1, obwohl es sich um Isoenzyme von verschiedenen Spezies handelte (Schwein bzw. Kaninchen).

Diskussion

Dem Verschwinden einer intravenös injizierten Substanz aus dem Blutplasma können grundsätzlich die in der Abbildung 2 schematisch dargestellten Prozesse zugrunde

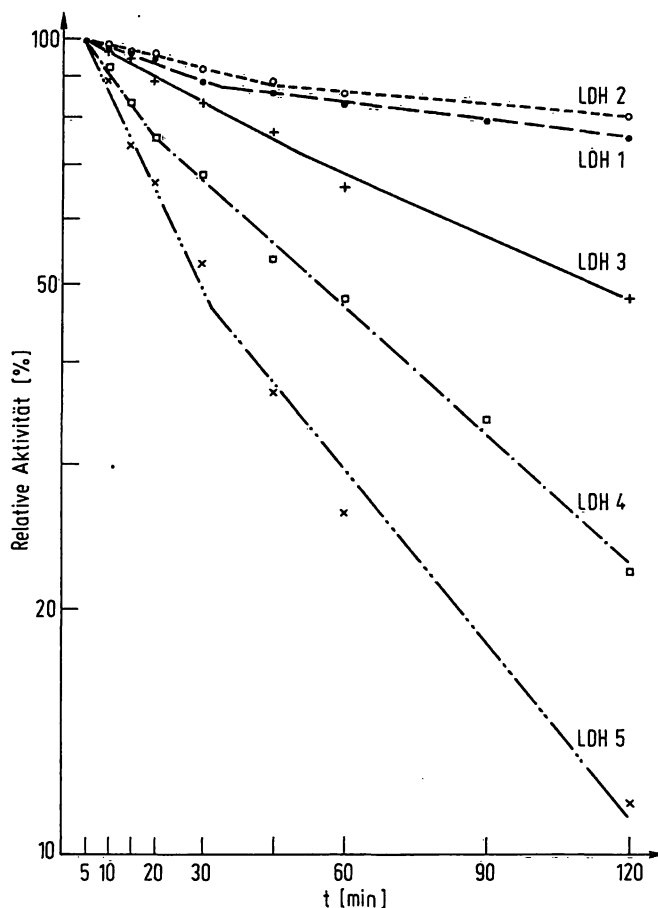


Abb. 1. Verteilung und Elimination heterologer Isoenzyme der Lactatdehydrogenase aus dem Blutplasma der Ratte nach intravenöser Injektion. Relative Aktivität (%) bezogen auf den Wert 5 min nach Injektion
Zeichenerklärung: LDH 1 = Isoenzym 1 (H_4) der Lactatdehydrogenase; LDH 2 = Isoenzym 2 (H_3M); LDH 3 = Isoenzym 3 (H_2M_2); LDH 4 = Isoenzym 4 (HM_3); LDH 5 = Isoenzym 5 (M_4).

$$\ln A = \ln A_0 - kt$$

	1. Phase		2. Phase		N
	T/2 [min]	r	T/2 [min]	r	
LDH 1	143	.9835	408	.9992	5
LDH 2	211	.9886	546	.9827	5
LDH 3	93	.9800	117	.9871	4
LDH 4	37	.9981	54	.9919	8
LDH 5	24	.9954	43	.9892	6

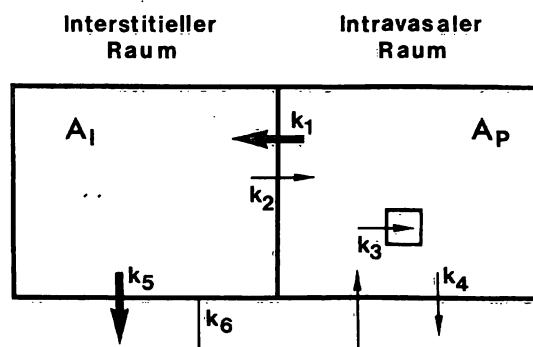


Abb. 2. Schematische Darstellung der auf eine intravenöse Injektion von Enzymaktivitäten folgenden Prozesse. Erklärung im Text.

liegen. Die durch die Konstanten k_1 und k_2 charakterisierten Vorgänge geben ein Maß für die Kapillarpermeabilität. Falls nach der Injektion die Plasma-Konzentration oder -Aktivität (A_p) um ein Vielfaches gegenüber der Aktivität im Interstitium (A_i) erhöht ist, kann, zumindest in der Anfangsphase des Austausches, k_2 vernachlässigt werden; gleichfalls in der Anfangsphase zu vernachlässigen ist der Rückstrom über die Lymphe (k_6), da die kurz nach der Injektion in den Intravasalraum einströmende Lymphe sich bereits vorher in den größeren Lymphgefäßen befand, in denen kein Austausch mehr möglich ist. Bei zweiphasiger Kinetik der Aktivitätsabnahme ist die erste Phase bestimmt durch

$$A_p = A_{p0} \cdot e^{-(k_1 + k_3 + k_4) \cdot t}$$

die zweite Phase, nach Erreichen eines Verteilungs-Gleichgewichtes, zwischen Interstitium und Intravasalraum durch

$$A_p = A_{p0} \cdot e^{-(k_3 + k_4 + k_5 - k_6) \cdot t}$$

(A_{p0} ist die Aktivität im Plasma extrapoliert auf den Zeitpunkt $t = 0$).

Die Konstante k_4 stellt ein Maß für die *direkte* Elimination aus dem Plasma dar, die auch – wie im Falle von Enzymen denkbar – eine intravasale Inaktivierung einschließt. Eine direkte Elimination aus dem Plasma z. B. durch Filtration in der Niere kann bei Molekulargewichten von größer als 60 000 weitgehend ausgeschlossen werden. Aus Studien mit radioaktiv markierten Enzymen ist bekannt, daß eine intravasale Inaktivierung von Enzymen bilanzmäßig nicht ins Gewicht fallen kann (3, 6, 7). Eine Aufnahme der injizierten Enzyme durch Blutzellen, in erster Linie Leukozyten, wie durch k_3 dargestellt, ist zwar nach den Untersuchungen von Bär et al. (3) nicht mit Sicherheit auszuschließen; jedoch kann dieser Prozeß nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen, da sich die Halbwertszeiten intravenös injizierter ^{14}C -Lactatdehydrogenase in Blut und Plasma nur unwesentlich voneinander unterscheiden und zudem auch in Organen, die nicht dem lymphatischen System zuzuordnen sind, Radioaktivität angereichert wurde. Demnach muß die Kinetik der Aktivitätsabnahme kurz nach der Enzym-Injektion in erster Linie durch k_1 und k_5 bestimmt sein, ist k_1 deutlich größer als k_5 , muß eine zweiphasige Kinetik resultieren.

1. Phase (Verteilung): $A_p = A_{p0} \cdot e^{-k_1 \cdot t}$

2. Phase (Elimination): $A_p = A_{p0} \cdot e^{-(k_5 - k_6) \cdot t}$

Ist k_5 hingegen gleich oder größer als k_1 , wird ein Verteilungsgleichgewicht nicht erreicht; es resultiert eine einphasige Kinetik. Bestimmend für die Geschwindigkeit der Aktivitätsabnahme ist in diesem Fall lediglich k_1 :

$$A_p = A_{p0} \cdot e^{-k_1 \cdot t}$$

Es ist also in jedem Falle zulässig, die ermittelten Konstanten (bei zweiphasiger Kinetik die Konstante der ersten Phase) bzw. Halbwertszeiten als Maß für die Kapillarpermeabilität heranzuziehen, wobei einschränkend hinzugefügt werden muß, daß diese Überlegung nur für

eine kurze Zeitspanne unmittelbar nach der Injektion gilt.

In der Abbildung 3 sind für heterologe, homologe und autologe Enzyme die Molekulargewichte gegen die für die Verteilung ermittelten Halbwertszeiten aufgetragen. Bei heterologen Enzymen besteht keine Beziehung zwischen beiden Größen. Für homologe und autologe Enzyme wurde hingegen ein enger Zusammenhang gefunden.

Homolog: $\ln \text{MG} = 0,470 \cdot \ln T/2 + 9,87$ ($r = 0,901$),

Autolog: $\ln \text{MG} = 0,532 \cdot \ln T/2 + 9,54$ ($r = 0,917$).

Da die Halbwertszeiten in der frühen Verteilungsphase, wie oben erläutert, allein durch die Kapillarpermeabilität bestimmt sind, kann festgestellt werden, daß die Diffusion homologer und autologer Enzyme durch die Kapillarmembran und damit der Austausch von Enzymaktivität zwi-

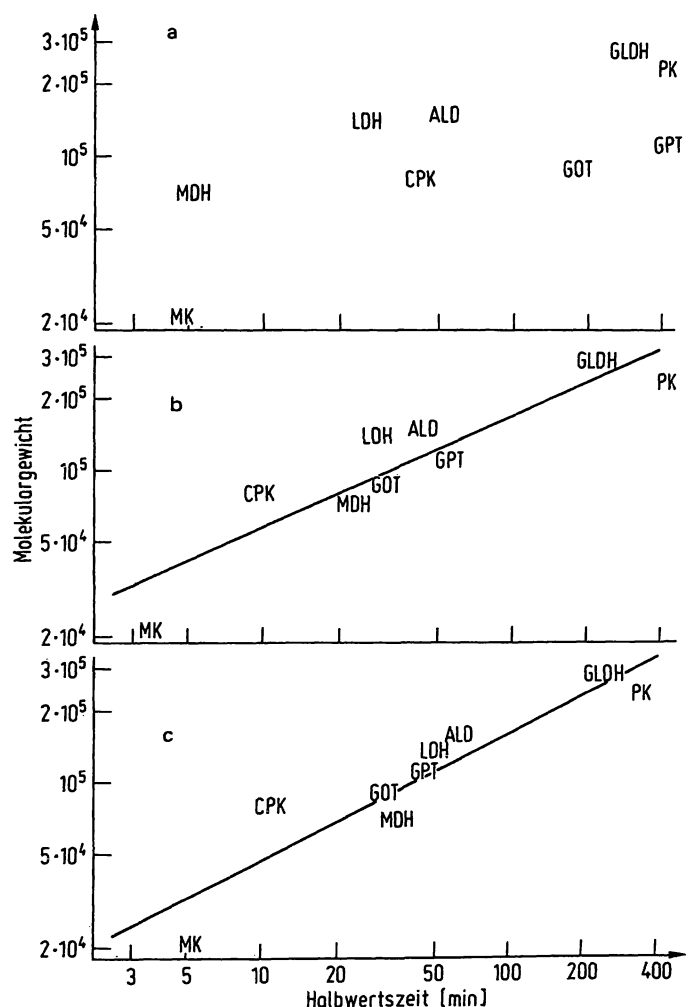


Abb. 3. Beziehung zwischen den Molekulargewichten (MG) heterologer (a), homologer (b) und autologer (c) Enzyme und ihren Halbwertszeiten ($T/2$) in der Verteilungsphase nach intravenöser Injektion. Molekulargewichte nach Barman (8) und Bergmeyer et al. (9). Für die Glutamatdehydrogenase wurde das MG der kleinsten enzymatisch aktiven Untereinheit eingesetzt (10).

Zeichenerklärung: LDH = Lactatdehydrogenase; MDH = Malatdehydrogenase; GLDH = Glutamatdehydrogenase; GOT = Aspartataminotransferase; GPT = Alaninaminotransferase; PK = Pyruvatkinase; CPK = Creatinkinase; MK = Adenylatkinase; ALD = Aldolase.

schen Intravasalraum und Interstitium direkt vom Molekulargewicht bzw. der Molekülgröße der Enzyme abhängt. Diese Feststellung deckt sich mit dem in der vorangegangenen Mitteilung (1) erhobenen Befund, daß die Aktivitätsquotienten Plasma/Lymphe ebenfalls eine Funktion des Molekulargewichtes darstellen, da die Einstellung dieser Quotienten durch die Kapillarpermeabilität mit bestimmt ist.

Die Verteilung heterologer Enzyme folgt demgegenüber keiner Gesetzmäßigkeit. Die gefundenen Unterschiede in den Halbwertszeiten gegenüber Enzymen homologen und autologen Ursprungs weisen nicht einmal einen einheitlichen Trend auf. Es fällt daher außerordentlich schwer, eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten zu finden. Als heterologe Enzyme wurden in jedem Falle kristalline Enzympräparationen verwendet, die im Laufe der zahlreichen Reinigungsschritte relativ unphysiologischen Einflüssen ausgesetzt waren. Eine partielle und in ihrem Ausmaß je nach Präparation sehr unterschiedliche Denaturierung und Konformationsänderung der Enzymmoleküle ist dabei unvermeidbar. Dies mag eine der Ursachen für die beobachteten Unterschiede in der Verteilung von heterologen (kristallinen) und homologen wie autologen (nativen) Enzymen sein. Besonders auffallend ist die starke Verlangsamung der Verteilung bei Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase und Creatinkinase. Bei der Aspartataminotransferase und der Alaninaminotransferase könnte das in einer partiellen Auffaltung der Tertiärstruktur und damit in einer Abweichung von der globulären Form begründet sein. Zu denken wäre auch an eine Veränderung der Hydrathülle und des Ladungszustandes.

Bei der Creatinkinase ist eher anzunehmen, daß für die raschere Verteilung eine leichtere Dissoziation des homologen und des autologen Enzymes in die beiden Untereinheiten verantwortlich ist. Würde nämlich ein Molekulargewicht von 40 500 statt 81 000 angenommen, ergäbe sich eine Halbwertszeit von 6,5 min für das homologe und 10,3 min für das autologe Enzym. Tatsächlich gemessen wurden 8,8 min bzw. 10,6 min. (Die Berechnung von $T/2$ für ein MG von 40 500 erfolgte mit Regressionsgeraden, die unter Ausschluß der Creatinkinase-Werte ermittelt wurden.

Für homologe Enzyme:

$$\ln MG = 0,515 \cdot \ln T/2 + 9,65, r = 0,925;$$

für autologe Enzyme:

$$\ln MG = 0,603 \cdot \ln T/2 + 9,20, r = 0,955).$$

In Analogie hierzu liegt bei der heterologen Malatdehydrogenase die Vermutung nahe, daß die rasche Verteilung auf eine erleichterte Dissoziation des dimeren Enzymmoleküls in der rein dargestellten Form zurückzuführen ist. Der Meßwert von 5,3 min für die Halbwertszeit würde nach dem ermittelten Zusammenhang zwischen MG und $T/2$ bei Molekulargewichten um 35 000 zu erwarten sein. Zu berücksichtigen wäre noch, daß bei bilokulären Enzymen wie Malatdehydrogenase und Aspartataminotransferase

unterschiedliche Halbwertszeiten für das mitochondriale und das cytoplasmatische Enzym gefunden wurden (3, 11) und daß dieses Phänomen unsere Versuchsergebnisse hätte beeinflussen können. Die injizierte heterologe Malatdehydrogenase war rein mitochondrial; beim homologen und autologen Enzym handelt es sich um ein Gemisch der mitochondrialen und cytoplasmatischen Form. In keinem Falle könnte man jedoch hiermit die gefundenen Unterschiede bei unilokulären Enzymen wie z. B. Alaninaminotransferase erklären.

Völlig unklar bleiben die in der Abbildung 1 dargestellten Unterschiede in der Verteilung und Elimination heterologer Lactatdehydrogenase-Isoenzyme. Die Befunde decken sich mit Angaben aus der Literatur (3–5) und ergänzen diese nun um Daten für das Versuchstier Ratte. Es läge nahe, auch hier an eine unterschiedliche Dissoziation der Untereinheiten H und M zu denken. Bisher gibt es allerdings keine Anhaltspunkte dafür, daß die Lactatdehydrogenase unter physiologischen Bedingungen und extrazellulär in ihre Untereinheiten dissoziieren kann.

Die für homologe und autologe Enzyme erhobenen Befunde könnten wegen der Verwendung von Organextrakten verfälscht sein, da diese sicher vasoaktive und kurzfristig auf die Kapillarpermeabilität wirksame Substanzen enthalten. Die Tatsache allerdings, daß nur für homologe und autologe Enzyme eine strenge Gesetzmäßigkeit gefunden wurde, die auch theoretisch plausibel ist, läßt die Möglichkeit einer durch diese Versuchsanordnung bedingten Beeinträchtigung der Ergebnisse unbedeutend erscheinen. Darüber hinaus haben wir in vorerst orientierenden Versuchen beobachtet, daß bei der Ratte auch für die Verteilung menschlicher Enzyme Unterschiede zwischen Organextrakten und stark angereicherten Enzympräparationen auftreten. Bei der Malatdehydrogenase nimmt mit zunehmender Anreicherung des Enzyms seine Halbwertszeit in der Verteilungsphase signifikant von 22,0 auf 16,6 min ab ($2P < 0,01$), bei der Aspartataminotransferase steigt sie an von 120 auf 630 min (*Mühlhaus & Friedel*, unveröffentlicht). Auch diese Zahlen vermögen die oben geäußerte Vermutung zu belegen, daß vornehmlich das Isolierverfahren für die beobachteten Unterschiede verantwortlich zu machen ist.

Die für einige Enzyme gefundene extrem langsame Verteilung nach intravenöser Injektion kann zur Bestimmung des Plasma- und Blutvolumens von Versuchstieren ausgenutzt werden. Von *Amelung* (12) wurde schon 1960 auf diese Möglichkeit hingewiesen; er empfahl, Alkoholdehydrogenase aus Hefe als Indikatortransubstanz zu verwenden. Wir selbst haben bei Ratten und Hunden ausgezeichnete Erfahrungen mit Glutamatdehydrogenase gemacht (13), von *Posen et al.* (14) wurde sogar beim Menschen das Plasmavolumen mit Hilfe von intravenös injizierter homologer Alkalischer Phosphatase bestimmt.

Zum Problem der eng mit der Verteilung verknüpften Elimination von Zellenzymen aus dem Organismus vermögen die hier berichteten Ergebnisse nur wenig beizutragen, da die Versuche längstens 240 min andauerten. Wir können lediglich davor warnen, heterologe und/oder kristalline Enzyme zu verwenden, wenn Elimi-

nations-Geschwindigkeiten ermittelt werden sollen. Ob die beschriebenen Unterschiede sich auch auf den Mechanismus der eigentlichen Elimination auswirken, muß offenbleiben. Aus den in der Tabelle 1 aufgeführten Daten kann geschlossen werden, daß bei der Elimination von Malatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und Pyruvatkinase die Verteilung, also die Diffusion durch die Kapillarmembran geschwindigkeitsbestimmend ist. Die eigentliche Eliminationsphase kann bei diesen Enzymen nicht von der Verteilungsphase abgegrenzt werden; die Elimination verläuft demnach schneller als die Verteilung. Zumindest für diese Enzyme muß bezweifelt werden, ob es zulässig ist, ihre Elimination über den Versuchsansatz der intravenösen Injektion zu studieren. Für die übrigen in der Tabelle 1 aufgeführten Enzyme läßt sich aus den Ergebnissen belegen, daß das Molekulargewicht

von Zellenzymen keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit ihrer eigentlichen Elimination hat.

Falls auch beim Menschen für einzelne Enzyme die Verteilung geschwindigkeitsbestimmend bei ihrer Elimination sein sollte, muß gefragt werden, ob es überhaupt sinnvoll ist, aus Verlaufsbeobachtungen nach einem akuten Krankheitsereignis Eliminationsraten zu ermitteln, mit dem Ziel hieraus und unter Berücksichtigung der aktuellen Aktivität im Plasma auf das Ausmaß des Zellschadens zu schließen (Literatur bei l.c. (2), (15), (16)). Derartige Untersuchungen können erst nach Erreichen eines Verteilungsgleichgewichtes durchgeführt werden, wenn also der Ausstrom von Enzymaktivität aus dem Plasma den Einstrom überwiegt. (Theoretisch wäre ein Sistieren des Zustroms zu fordern, ein Zustand, der nicht eintreten kann, da ständig Enzyme über die Lymphe nachströmen.) Unter der Voraussetzung, daß eine Zellschädigung nur kurzfristig eintritt und keine Enzymaktivitäten aus dem intrazellulären Raum mehr nachströmen, ist die Erreichung des Verteilungsgleichgewichtes nach der schematischen Darstellung in Abbildung 2 abhängig von k_2 , k_5 und k_6 .

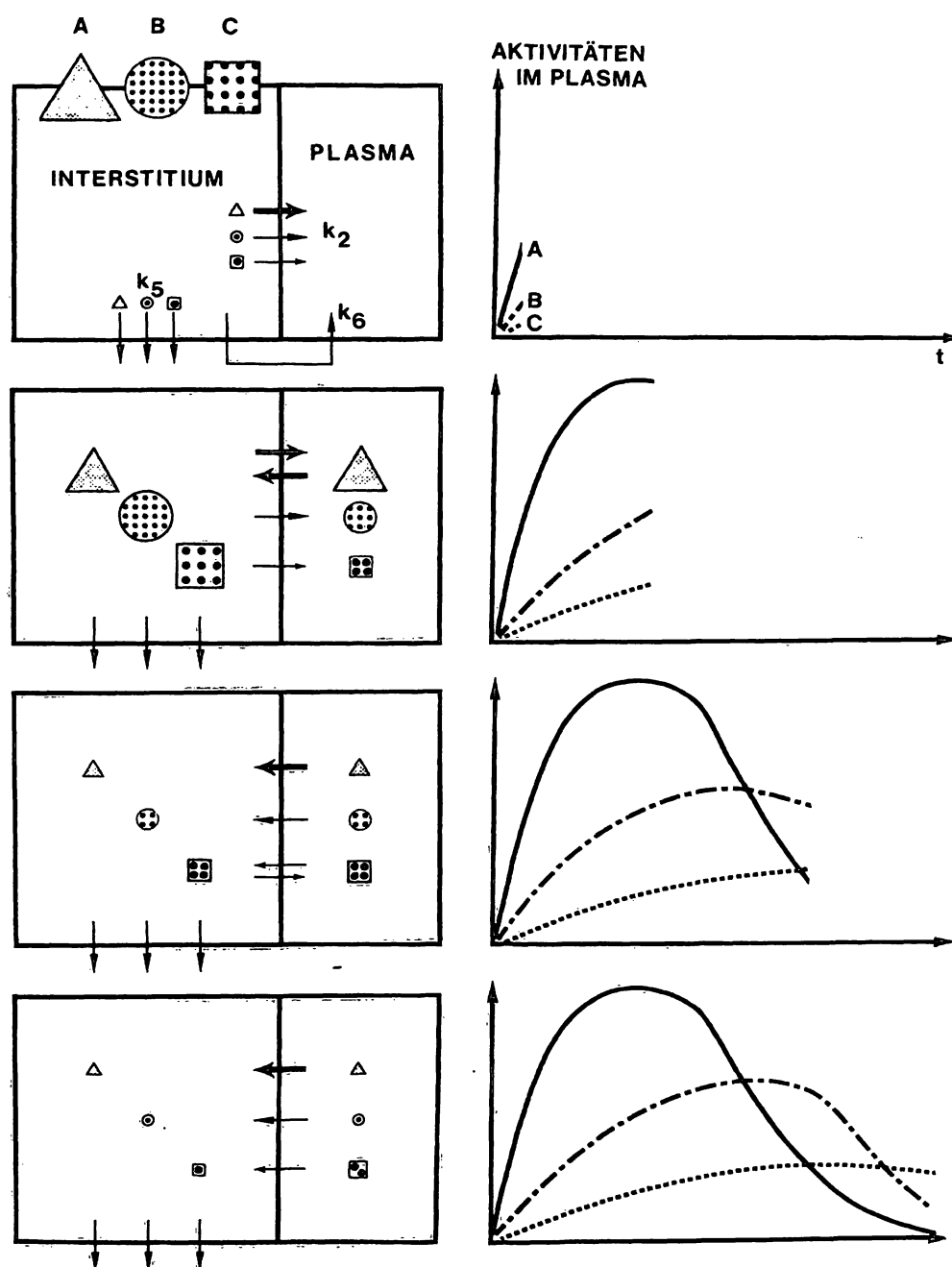


Abb. 4. Einfluß von Verteilung, Transport und Elimination auf Enzymaktivitäten im Plasma. Erklärung im Text.

In der Abbildung 4 ist an drei Beispielen schematisch dargestellt, welchen Einfluß unterschiedliche Verteilungsgeschwindigkeiten auf die absolute Höhe von pathologisch im Plasma auftretenden Enzymaktivitäten und auf ihre Elimination haben können. Die Bezeichnung der Konstanten wurde aus der Abbildung 2 übernommen. Ausgehend von der Annahme, daß zum gleichen Zeitpunkt drei Enzyme A, B und C einmalig und mit identischer Aktivität vom intrazellulären Raum in das Interstitium gelangen, wurden die folgenden Voraussetzungen getroffen:

Molekulargewicht: $A < B < C$

Konstante k_2 (direkter Übertritt in den Intravasalraum):
für $A > B > C$,

Konstante k_5 (Elimination aus dem Interstitium):
für $A = B = C$,

Konstante k_6 (Lymphtransport):
für $A = B = C$ (nur zu Beginn),

Für A: $k_1 > k_5$; für B: $k_1 \geq k_5$; für C: $k_1 < k_5$.

Außerdem wurde vorausgesetzt, daß nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Interstitium und Intravasalraum die den Rückstrom von Enzymaktivität über die Kapillarmembran charakterisierende Konstante k_1 identisch mit der jeweils zugehörigen Konstante k_2 ist. Allein wegen der unterschiedlichen Größen für k_2 müssen im Plasma Zu- und Abnahme der Aktivitäten von A, B und C völlig unterschiedliche Verläufe nehmen. Die Aktivität von A steigt rasch an, erreicht relativ früh ein hohes aber schmales Maximum und fällt dann exponentiell ab, geschwindigkeitsbestimmend ist k_5 . B zeigt ein breiteres niedrigeres Maximum zu einem späteren Zeitpunkt; da $k_1 \geq k_5$ ist, verläuft der Aktivitätsabfall wie bei A. Relativ spät wird ein sehr breites, niedriges Aktivitätsmaximum für C erreicht, der Abfall der Aktivität verläuft langsamer als bei A und B, da $k_1 < k_5$ und damit k_1 geschwindigkeitsbestimmend für die Elimination aus dem Plasma ist.

Bei einer Vernachlässigung der Verteilungs- und Transportvorgänge würde eine Bewertung der Aktivitäten von A, B und C im Plasma und ihrer Verlaufskurven etwa wie folgt ausfallen:

a) Austritt: $A > B > C$.

Diese Bewertung wäre falsch. Falsch wären auch alle Schlussfolgerungen, die sich ergäben, wenn hierauf aufbauend Korrelationen zwischen Molekulargewicht und Enzymaustritt gesucht würden.

b) Halbwertszeit im Plasma: $A = B > C$.

Diese Bewertung wäre richtig. Irreführend wäre es hingegen, würde man versuchen, aus diesen Halbwertszeiten und einem beliebigen Punkt im abfallenden Teil der Verlaufskurven etwa durch Extrapolation das Ausmaß des Enzymaustritts zum Zeitpunkt des Schadensereignisses abzuschätzen. Für A und B wäre dieses Vorgehen zwar korrekt und lieferte auch verwertbare Ergebnisse, für C dagegen würde eine völlig falsche Aussage resultieren, da die Kinetik der Verteilung (k_1) als Grundlage für die Extrapolation diene und nicht die der eigentlichen Elimination (k_5).

An einer neueren Arbeit von Sweetin & Thompson (17), in der die Hypothese aufgestellt wird, daß intravenös injizierte Creatinkinase von der Muskulatur eliminiert wird, wird auch für praktische Belange besonders deutlich wie eine Vernachlässigung der Verteilung zu einer Fehlinterpretation von Versuchsergebnissen führen kann. In dieser Studie wurden bei einem der drei Versuchstiere nach der Injektion und dem ersten steilen Aktivitätsabfall zweimal starke Aktivitätsanstiege im Plasma beobachtet und zwar dann, wenn das Tier sich bewegte und ein peripheres Ödem verschwand. Im Anschluß an diese Aktivitätsanstiege fiel die Enzymaktivität jedesmal steil ab. Diese als Enzymaustritt gedeuteten Aktivitätsanstiege hätten wahrscheinlich eher auf einen Einstrom interstitiell (Ödem!) abgelagerter Enzymaktivität in den Intravasalraum durch die Lymphe zurückgeführt werden müssen. Die in beiden Fällen nachfolgende besonders steile Abnahme von Enzymaktivität, die der Elimination zugerechnet und in Beziehung zur physiologischen Aktivität des Versuchstieres gesetzt wurde, kann hinreichend durch ein erneutes Einsetzen der Verteilung erklärt werden, da durch den Einstrom von Enzymaktivität in den Intravasalraum das Fließgleichgewicht zwischen diesem und dem Intravasalraum gestört worden sein müßte.

Literatur

1. Friedel, R., Bode, R., Trautschold, I. & Mattenheimer, H. (1976), diese Z. 14, 119–128.
2. Bär, U. & Ohlendorf, S. (1970). Klin. Wochenschr. 48, 776–780.
3. Bär, U., Friedel, R., Heine, H., Mayer, D., Ohlendorf, S., Schmidt, F. W. & Trautschold, I. (1972/73). Enzyme 14, 133–156.
4. Boyd, J. W. (1967). Biochim. Biophys. Acta 132, 221–231.
5. Stein, I. D. (1970). J. Lab. Clin. Med. 76, 76–84.
6. Massarrat, S. (1968). Z. Gesamte Exp. Med. 148, 56–71.
7. Boyd, J. W. (1967). Biochim. Biophys. Acta 146, 587–593.
8. Barman, T. E. (1969). Enzyme Handbook, Springer, Berlin/Heidelberg/New York.
9. Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassl, M. (1970), in Methoden der enzymatischen Analyse, (Bergmeyer, H. U. ed.), 2. Auflage, S. 388. Verlag Chemie, Weinheim.
10. Sund, H. & Burchard, W. (1968). Eur. J. Biochem. 6, 202 bis 206.
11. Fleisher, G. A. & Wakim, K. G. (1963). J. Lab. Clin. Med. 61, 98–106.
12. Amelung, D. (1960). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 318, 219–228.
13. Dornow, H., Friedel, R. & Trautschold, I. (1972), in: Fortschritte der Klinischen Chemie, Enzyme und Hormone, (Kaiser, E. ed.), S. 175. Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien.
14. Posen, S., Clubb, J. S., Neale, F. C. & Hotchkis, D. (1965). J. Lab. Clin. Med. 65, 530–538.
15. Amelung, D. (1968), in: Praktische Enzymologie (Schmidt, F. W., ed.), S. 149. Huber, Bern/Stuttgart.
16. Posen, S. (1970). Clin. Chem. 16, 71–84.
17. Sweetin, J. C. & Thomson, W. H. S. (1973). Clin. Chim. Acta 48, 403–411.

Priv.-Doz. Dr. R. Friedel
Inst. f. Klin. Biochemie
u. Physiol. Chemie der MHH
Karl-Wiechert-Allee 9
3000 Hannover 61